Agilent 1200 RRLC と 6410 トリプル四重極質量分析計を用いた尿中エチルグルクロニドの定量分析

アプリケーション

法医学

著者

Julie Marr, Dustin Yaworsky, and Rita Steed
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Jeffrey Keever
Agilent Technologies, Inc.
200 Regency Forest Drive
Cary, NC 27518
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S Meridian Blvd., MS 1-1E
Englewood, Colorado 80112
USA

Deborah Tinnemore and Bert Toivola
Sterling Reference Laboratories
2617 East L Street, Suite A
Tacoma, WA 98421
USA

要旨

Agilent 1200 シリーズラピッドレゾリューション液体クロマトグラフ (RRLC) システムと、ネガティブイオンモードの G1948B エレクトロスプレーイオン源 (ESI) を備えた 6410 トリプル四重極質量分析計を用いて、アルコール摂取を検出するためのバイオマーカーであるエチルグルクロニド (EtG) を測定しました。本研究におけるキャリブレーション範囲は、尿中 EtG 250 ng/mL ～ 2,500 ng/mL です。3 x 250 mm (粒径 5 µm) の ZORBAX Eclipse XDB-C18 カラムに、流量 800 µL/min で、サンプル 10 µL を注入し、優れた再現性と直線性のある実験結果を得ました。高速定量により、EtG のリテンションタイムは 2.2 分でした。

緒言

エチルグルクロニド (EtG) は、アルコールの摂取を直接調べるバイオマーカーとして使用されるエタノールの微量代謝物です。EtG はグルクロン酸化により肝臓中で形成され、摂取したエタノール全量の 0.1% 未満が EtG に変換されます。EtG はエタノール摂取後 72 ～ 96 時間まで尿中で検出することができ、エタノールの検出可能時間が 12 ～ 14 時間であることと比べると、大幅に長くなります。尿中エタノールの検出には、検出時間が短いことに加え、発酵によるエタノールの生成という別の問題があります。これは、糖尿病患者のアルコール摂取をモニタリングする上で起こり得る問題です。一方 EtG は発酵によっては生成されず、肝臓にアルコールが入った場合のみ尿中で検出されます。ヒトから収集した尿中の EtG 濃度は、アルコールを飲まない人の検出不能なレベルから、慢性依存症者の 1 mg/mL 以上までに及びます。

アルコール治療プログラムでは、100 ng/mL をアルコール摂取マーカーの陽性カットオフ値としています。しかし、市販薬剤、アルコール含有洗口剤、ハンド用除菌ローション、食品、化粧品などが偶発的に 100 ng/mL

の EtG を生成する可能性があります。これを未然に防ぐために、多くのラボや治療プログラムでは、250 または 500 ng/mL といった、より高い値を陽性カットオフ値としています。これにより偶発的アルコール生成による EtG 陽性の問題はなくなりますが、アルコールの検出時間枠も低減します。STERLING Reference Laboratories では、大部分のプログラムで 250 ng/mL をカットオフ値とし、総陽性率は約 20% です。EtG 検出は、アルコールの摂取を厳しく制限する必要のあるプログラムにおいて有益なツールです。しかし他の薬物マーカーと同様、EtG 濃度をアルコール摂取の唯一の基準とすることは危険で、他の要素も含めて熟練したカウンセラーや専門家が総合的に評価する必要があります。

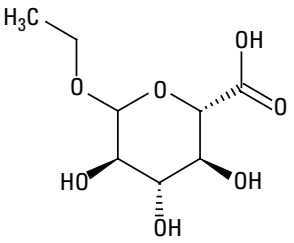
物質の特徴をより明確にするには、LC/MS/MS 質量分析装置が有効です。使用するトリプル四重極 LC/MS では、EtG プリカーサイオンを選択し、その構造特有の生成イオンを選択します。キャリブレーション標準、品質管理 (QC) サンプル、患者サンプルなどのバッチの中で、より強度の高い生成イオンを定量用に、あまり強度が高くないイオンは EtG の存在を確認するための定性用に選択します。サンプル抽出回収率の効果とマトリクス効果を説明するために、内部標準を追加し、確認のための類似要件を用いて分析します。

EtG は水溶性で安定ですが、熱には不安定で、誘導体化せずに GC/MS で分析するのは困難です。この物質にはカルボン酸も含まれており、エレクトロスプレーイオン化が特に有効で、溶液中で脱プロトン化イオンを形成します。

本書では、EtG の分析範囲を 250 ～ 2,500 ng/mL とします。10 個の尿サンプルで EtG の分析をし、3 つの QC、211、383、1,594 ng/mL を含むことがわかりました。Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計では、感度が十分得られるので、カラム汚染を減らすために溶媒 (0.1% ギ酸) を 10 倍希釈しました。溶媒を 20 倍から 25 倍希釈しても分析可能な感度が保証されました。

検量線から得られたコントロールサンプルの定量精度は、それぞれ、94、94、98% でした。さらに、分析した 10 個のサンプルのうち 7 検体が陽性、つまり 250 ng/mL のカットオフ値を上回る濃度でした。

図 1 に EtG の構造式を示します。



EtG
$[M–H]^-$ = 221.1

図 1. エチルグルクロニドの構造式と関連する脱プロトン体の *m/z*

実験

サンプル前処理

EtG 標準とその重水素化類似物 (D5) は、それぞれ 10 mg/mL と 0.1 mg/mL のメタノール溶液として、Sterling Reference Labs (SRL) から入手しました。標準試料は、0.1% ギ酸水溶液 (v/v) で希釈しました。得られたキャリブレーション濃度レベルは、250、1,000、2,500 ng/mL です。未ろ過コントロール尿サンプルと品質管理サンプル (QC) も SRL から入手しました。3 つの QC サンプルは、それぞれ 211、383、1,594 ng/mL であることがわかっています。すべてのサンプルの内部標準濃度は 500 ng/mL です。希釈標準試料、QC サンプル、患者サンプル各 50 µL に、D5 内部標準 450 µL を添加しました。

LC/MS メソッド詳細

LC 条件

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ、デガッサ、冷却機能付きウェルプレートサンプラ、カラムコンパートメント

サンプル温度:	10 °C
ニードル洗浄:	(50:50 メタノール/水) – フラッシュポート 3 秒
カラム:	Agilent ZORBAX XDB-C18、 3.0 mm × 250 mm、5 µm (部品番号: 990967-302)
カラム温度:	45 °C
移動相:	90:10 水/メタノール溶液
(アイソクラティック)	(0.25% ギ酸含有)
流量:	0.8 mL/min;
注入量:	10 µL
ストップタイム:	4 分

MS 条件

モード:	Agilent G1948B イオン源 ネガティブ ESI
ネブライザ:	60 psig
ドライガス流量:	13 L/min
ドライガス温度:	350 °C
V_{cap}:	3,500 V

表 1.　6410 トリプル四重極質量分析計を用いて取り込まれた MRM 遷移

化合物	遷移	フラグメンタ (V)	衝突エネルギー (V)	デュエルタイム (msec)
EtG – クオンティファイア	221.0 > 85.0	140	12	200
EtG – クォリファイア	221.0 > 75.0			
D5 – EtG (IStd) – クオンティファイア	226.0 > 85.0			
D5 – EtG (IStd) – クォリファイア	226.0 > 75.0			

分解能 (FWHM):　　Q1 = 0.7 amu　　Q2 = 0.7 amu

表 1 に最適な感度を得るための MRM 遷移を示します。さらに、キャリーオーバーがないことを確認するために、適宜ブランクのサンプルランを行いました。ブランクサンプルは、0.1% ギ酸水溶液 50 µL と内部標準 450 µL の混合溶液です。

内部標準でサンプルと QC サンプルを 10 倍に希釈すると、未ろ過尿マトリクスによるシステムの汚染が低減します。さらに、未ろ過尿はカラム劣化の原因となるので、少なくとも日に 1 度、100% の有機溶媒でカラムを洗浄することを SRL は推奨しています。

結果と考察

本研究で得られた検量線を、図 2 に示します。相関係数は良好で R^2 > 0.999、直線型で原点を含まず、重み付けのない近似設定です。3 つの QC サンプルの定量精度は、94% (211 ng/mL)、94% (383 ng/mL)、98% (1,594 ng/mL) でした。注入量 10 µL と移動相の希釈率 1:10 から算出して分析したオンカラム注入量は、250 pg (250 ng/mL) ～ 2.5 ng (2,500 ng/mL) です。サチュレーションや非線形性は見られませんでした。

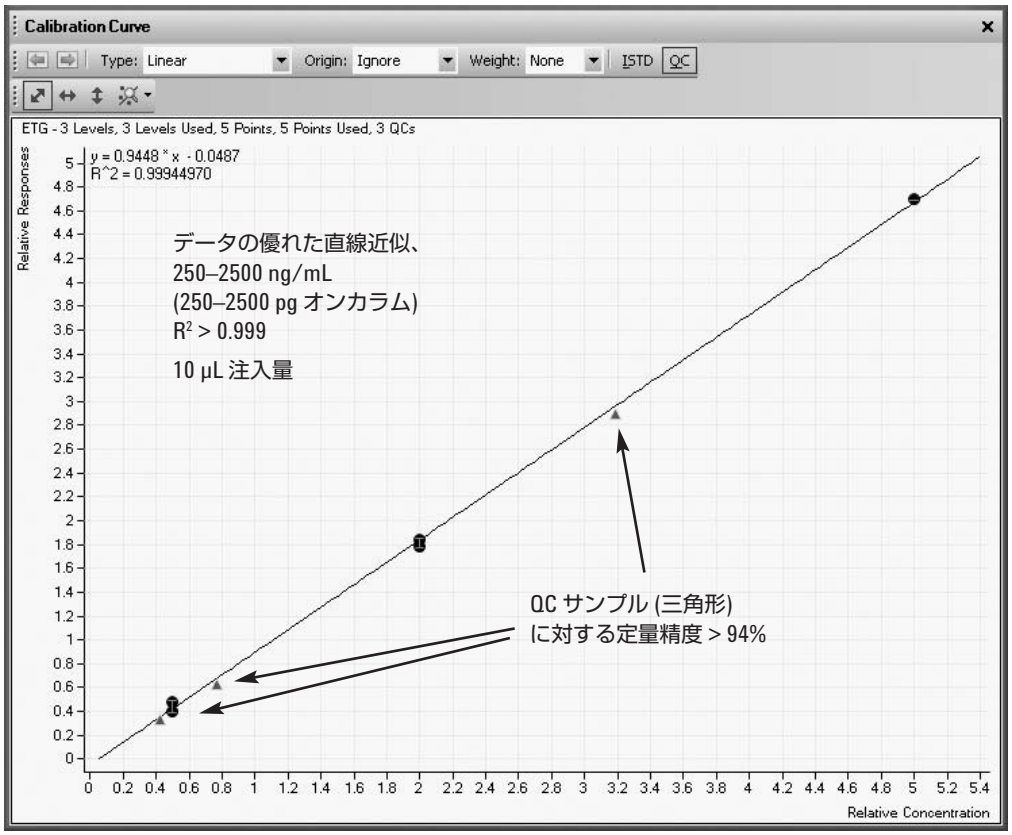


図 2.　分析範囲 250 ～ 2,500 ng/mL で優れた直線性。直線型の曲線近似設定値で、原点を含まず、重み付けはなし。内部標準による希釈と 10 µL の注入量から、オンカラム注入範囲は 250 ～ 2,500 pg。

確認のために、キャリブレーション濃度標準の 1 つを用いて、EtG 測定対象化合物と D5-EtG 内部標準のクォリファイアピーク面積イオン比を求めました。この比率は ± 20% の許容誤差ですべてのサンプルに適応しました。たとえば、EtG 分析対象化合物のクォリファイア/クオンティファイアイオン比は 84% であるので、すべてのクォリファイア/クオンティファイアイオン比は 84% の ± 20% 以内、または 67 ～ 101% の面積比範囲内でなければいけません。内部標準に関しても同様なことが言えます。キャリブレーション範囲内で定量されるすべてのサンプルが、この基準を満たしています。詳細は図 3 を参照してください。

すべてのサンプルの積分結果は、表 2 に記載してあります。尿サンプル 1,4,8 (「サンプル 1」、「サンプル 2」、「サンプル 8」) は、算出された濃度すべてが 250 ng/mL の定量曲線下限を下回ったため、陰性です。250 ～ 2,500 ng/mL の定量範囲内か、極めて陽性である他の

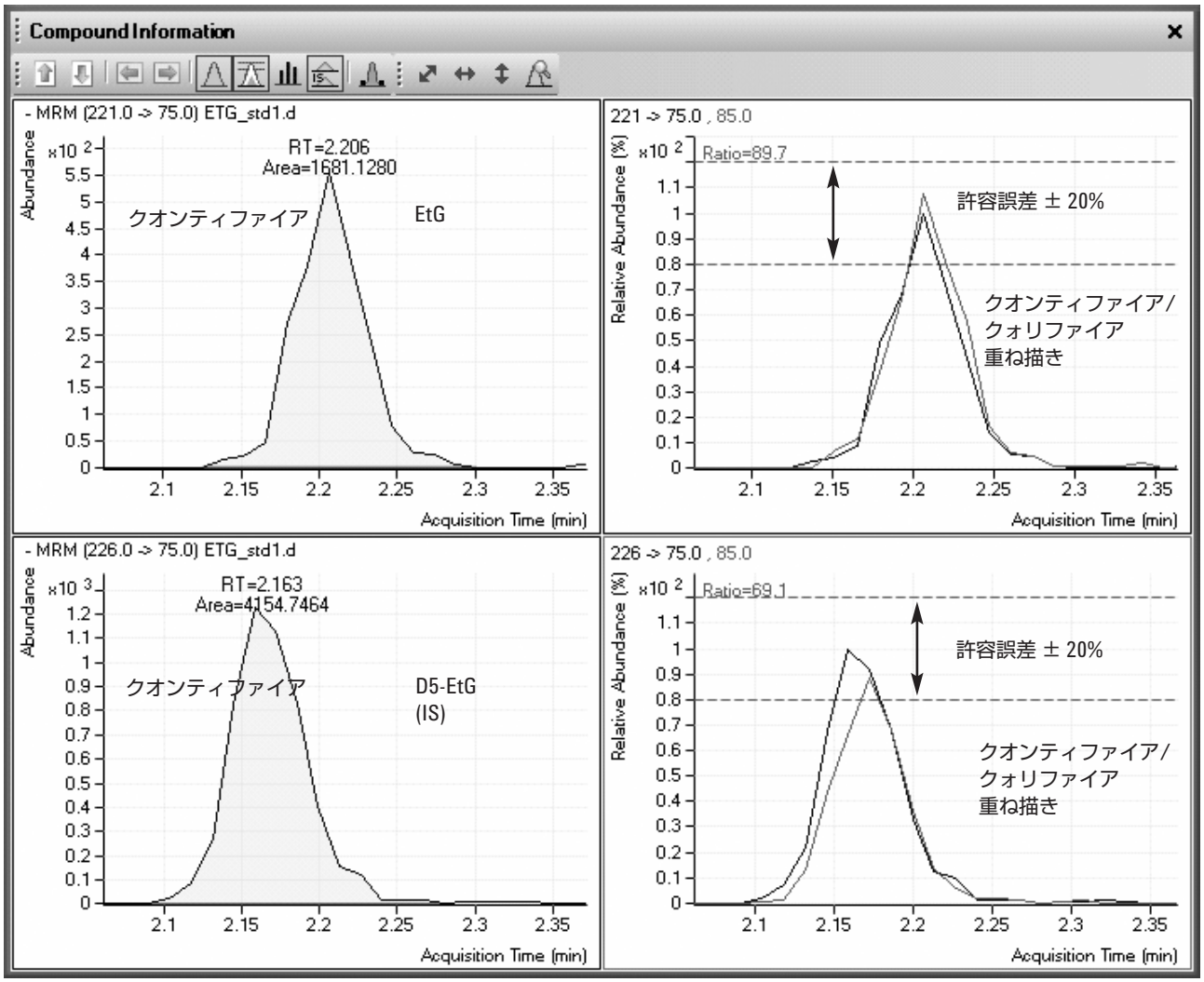


図 3. サンプル中の EtG の存在をクォリファイアイオン比に基づいて確認しました。図は 250 ng/mL のキャリブレーション標準を注入した様子。右側は面積カウントに基づく、クォリファイアとクオンティファイアイオンの重ね描き。

7 種類のサンプルを希釈し、再分析しました。QC1 を含む定量値 250 ng/mL 以上のサンプルのすべてが、EtG と D5-EtG 内部標準両方に対して、0.84 ± 20% のクォリファイアイオン比を満たすことも注意してください。

前述のとおり、品質管理サンプルに対する定量精度は、QC1 と QC2 では 94%、QC3 では 98% です。

最後に、キャリーオーバーがないことを実証するために、内部標準 (ISTD) を含むブランクサンプルの分析を行いました。

結論

EtG 化合物は、ネガティブエレクトロスプレーイオン化モードで定量できました。相関係数が、R^2 = 0.999 であることから、分析範囲全体にわたって良好な直線性が得られることがわかります。検量線は線形で原点を含まず、重み付けなしで定量できました。QC サンプルの定量精度は少なくとも 94% で良好、10 種類の尿サンプルのうち 7 種類は陽性と確認されました。下限値 250 ng/mL を上回るすべてのサンプルは、EtG と D5-EtG 内部標準両方のクォリファイアイオン比基準を満たしました。この研究では、尿中 EtG の確認と定量について、トリプル四重極質量分析装置が有効であることを実証しました。

表 2.　すべてのサンプルの積分結果

			EtG				D5-EtG	
種類	**レベル**	**予想濃度**	**RT**	**計算濃度**	**精度**	**比**	**RT**	**レスポンス**	**比**
Cal - 250	1	250	2.2	240	96.0	89.7	2.2	4154.7	69
Cal - 250	1	250	2.2	280	111.8	81.0	2.2	3914.7	82
Cal - 1000	2	1000	2.2	972	97.2	81.9	2.2	3325.7	79
Cal - 1000	2	1000	2.2	999	99.9	87.2	2.2	4032.8	83
Cal - 2500	3	2500	2.2	2510	100.4	81.2	2.2	4409.6	83
ブランク			2.2	29*			2.2	4509.8	79
QC1 - 211	4	211	2.2	199	94.4	84.2	2.2	4416.0	79
QC2 - 383	5	383	2.2	358	93.5	82.7	2.2	4457.6	80
QC3 - 1594	6	1594	2.2	1559	97.8	90.3	2.2	4223.3	80
ブランク				未検出			2.2	3983.9	88
サンプル 1			2.3	183		22.7	2.2	3809.3	77
サンプル 2			2.2	27865		82.9	2.2	3594.1	105
サンプル 3			2.2	81139		84.6	2.2	4089.2	82
サンプル 4			2.2	105		45.6	2.2	3491.7	85
サンプル 5			2.2	783269		84.7	2.2	1776.3	97
サンプル 6			2.2	5904		78.2	2.2	3253.2	85
サンプル 7			2.2	256		86.2	2.2	4876.2	80
サンプル 8			2.3	142		37.0	2.2	3890.6	88
サンプル 9			2.2	1428		85.1	2.2	4543.0	84
サンプル 10			2.2	370		67.5	2.2	2896.0	85

* 約 1% 残留

www.agilent.com/chem/jp

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
August 31, 2008
5989-7000JAJP

Agilent Technologies